Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

การทดสอบการใช้ได้ของวิธีทางเลือกในการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดผง

สุวรรณา เธียรอังกูร
สิรินันท์ ไทยตระกูลพาณิช
สิริมา สายรวมญาติ
กองเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ กองเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายได้ทดสอบการใช้ได้ของวิธีทางเลือก (SPC+TTC) ซึ่งมีการเติม ๐.๐๐๒๕% (w/v) ๒, ๓, ๕-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานการตรวจนับในจานเพาะเชื้อ (Standard Plate Count, SPC) สำหรับตรวจนับจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนในเครื่องสำอางชนิดผงที่ไม่ละลายน้ำหรือมีส่วนผสมที่ไม่ละลายน้ำจำนวน ๕๐ ตัวอย่าง ระหว่างเดือนพฤษภาคม-ธันวาคม ๒๕๔๘ พบว่าวิธี SPC+TTC มีความสัมพันธ์ดีมากและเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับวิธีมาตรฐาน โดยมีค่า r^2 เท่ากับ ๐.๕๔ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ ๐.๕๗ ความแม่นสัมพัทธ์ (relative accuracy) ของวิธีทางเลือก แสดงด้วยสมการเส้นตรง log Y = ๐.๐๔๑+ ๐.๕๕๕ log X ตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ด้วยกราฟ residual plot และ line fit คำนวณค่า F-distribution (α = ๐.๐๕) พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และความเที่ยงตรงของวิธี (methods precision) ประมาณได้จากค่า repeatability standard deviation (S_r) เท่ากับ ๐.๑๓๖ การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนด้วยวิธี SPC+TTC มีค่า critical level (LC), limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ) เท่ากับ ๒, ๓ และ ๒๐ cfu ตามลำดับ การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณโดยวิธี SPC+TTC ในเครื่องสำอางชนิดผงที่มีส่วนผสมที่ไม่ละลายน้ำจำนวน ๒๔ ตัวอย่าง มีค่า expanded uncertainty *(U)* เท่ากับ ± ๐.๐๔๑ log การเพิ่ม TTC ในวิธี SPC+TTC นี้ทำให้โคโลนีแบคทีเรียมีสีแดงสังเกตได้ชัดเจน ช่วยให้งานตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดผง สะดวกมากขึ้น ลดเวลาในการตรวจนับและให้ผลการตรวจนับที่แม่นยำ

คำสำคัญ: **จุลินทรีย์ปนเปื้อน, เครื่องสำอาง, การตรวจนับจำนวน, การทดสอบความใช้ได้ของวิธี**

บทนำ

จำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจัดเป็นดัชนีสำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถบ่งชี้สุขลักษณะในการผลิตและคุณภาพด้านจุลชีววิทยา[๑] ของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ ในประเทศไทยมีเกณฑ์มาตรฐานด้านจุลชีววิทยาออกโดยกระทรวงสาธารณสุข[๒] และ

กระทรวงอุตสาหกรรม[๗] กำหนดจำนวนแบคทีเรีย ยีสต์ และราทั้งหมดต้องไม่มากกว่า ๑,๐๐๐ โคโลนีต่อกรัม (colony forming unit/g, cfu/g) หรือมิลลิลิตรตัวอย่าง จำนวนเชื้อบ่งชี้สุขลักษณะต้องไม่มากกว่า ๑๐ MPN หรือโคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตรตัวอย่าง และต้องไม่พบจุลินทรีย์ที่อาจทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium* spp. เป็นต้น ซึ่งมีรายละเอียดแตกต่างกันไปบ้างตามชนิดของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ส่วนใหญ่จะใช้วิธีมาตรฐานการตรวจนับในจานเพาะเชื้อ (Standard Plate Count, SPC) กล่าวคือ เจือจางตัวอย่างเครื่องสำอางในสารละลายสำหรับเจือจางเพื่อให้ได้จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถตรวจนับในจานเพาะเชื้อได้ระหว่าง ๒๕-๒๕๐ โคโลนี[๔] จัดเป็นวิธีเบื้องต้นที่ผู้ผลิตนิยมใช้ในการตรวจสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยา เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดค่าใช้จ่าย แต่พบปัญหาในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรีย ในเครื่องสำอางชนิดผงที่ไม่ละลายหรือไม่กระจายตัวในสารละลายสำหรับเจือจาง เช่น เครื่องสำอางควบคุมชนิดแป้งฝุ่นโรยตัว รวมถึงเครื่องสำอางทั่วไปที่ปัจจุบันนิยมใช้ผงสมุนไพรชนิดต่าง ๆ เป็นส่วนผสม จะมีตะกอนหรือส่วนของตัวอย่างซึ่งอาจมีรูปทรงและขนาดใกล้เคียงกับโคโลนีแบคทีเรีย ปะปนในอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อ ทำให้การตรวจนับโคโลนีจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียไม่ชัดเจน ใช้เวลามากในการตรวจนับ และอาจมีการตรวจนับผิดพลาดได้ โดยเฉพาะการตรวจนับที่ระดับความเจือจางเริ่มต้น ๑:๑๐ ซึ่งยังมีตะกอนตัวอย่างผสมอยู่มาก จัดเป็นระดับความเจือจางที่สำคัญ เนื่องจากผลการตรวจนับจำนวนที่ระดับความเจือจางนี้ สามารถให้ค่าตรวจนับระหว่าง ๒๕๐ ถึง ๒,๕๐๐ โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ว่าผ่านหรือไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานด้านจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อน[๓,๗]

เพื่อพัฒนาการตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย ให้สามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญในอาหารวุ้นได้ชัดเจนและถูกต้องรวดเร็วขึ้น โดยเฉพาะที่ระดับความเจือจางเริ่มต้น ๑:๑๐ ห้องปฏิบัติการจึงได้ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์มาตรฐานการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อที่ใช้ในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ (SPC+TTC) โดยใช้ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ในปริมาณ ๐.๐๐๒๕% (w/v)[๕] TTC เป็นสีที่มีการแนะนำให้ใช้ในวิธีการตรวจอาหารที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนไม่มาก ทำให้ต้องตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารที่เจือจางน้อย[๔] และใช้ในวิธีการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนในยาและเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมที่ไม่ละลายน้ำ[๖] รวมถึงใช้ในวิธีการตรวจปริมาณ[๗] ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ[๘-๑๐] โดย TTC ในรูปออกซิไดส์ เป็นสารที่ละลายน้ำได้และไม่มีสี จุลินทรีย์ที่มีชีวิตจะลดทอน TTC โดยปฏิกิริยาเอนไซม์ ทำให้เกิด formazan ซึ่งมีสีแดงไม่ละลายน้ำและไม่เปลี่ยนสภาพกลับ[๑๑] formazan จะถูกเก็บภายในเซลล์[๑๒] ทำให้โคโลนีมีสีแดงช่วยในการจำแนกโคโลนีจุลินทรีย์ออกจากตะกอนของตัวอย่างที่ปะปนอยู่ในจานเพาะเชื้อ แต่การนำ TTC มาใช้ก็อาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้[๕,๑๓] ดังนั้นการเติม TTC เพิ่มในวิธี SPC นี้ ต้องมีการทดสอบการใช้ได้ของวิธี[๑๔] จึงรวบรวมข้อมูลการทดสอบที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ เพื่อประเมินความแม่นยำ สัมพัทธ์ และความเที่ยงของวิธี SPC+TTC เปรียบเทียบกับวิธี SPC รวมถึงประเมินข้อจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี SPC+TTC ก่อนที่จะนำมาใช้ในงานวิเคราะห์ประจำของห้องปฏิบัติการ และคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty)[๑๕] ของการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ด้วยวิธี SPC+TTC

วิธีการศึกษา

เป็นการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ กองเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ระหว่างเดือนพฤษภาคม-ธันวาคม ๒๕๔๘ เพื่อเปรียบเทียบการใช้ได้ของวิธีทางเลือก ซึ่งดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานการตรวจนับในจานเพาะเชื้อโดยเพิ่มขั้นตอนการเติมสาร TTC ๐.๐๐๒๕% (w/v) กับวิธีมาตรฐานเดิมที่ไม่มีการเติมสาร TTC

วัสดุ

๑. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปมีขั้นตอนการเตรียมและผสมตามที่กำหนดโดยบริษัทผู้ผลิต ได้แก่ Trypticase soy agar (TSA; Becton, Dickinson) สารละลายสำหรับเจือจาง Trypticase soy broth (TSB; Becton, Dickinson) + ๐.๑% Tween ๒๐ และ ๐.๑% Tween ๘๐ (TSBtw)[๑๗] และ ๑% ๒, ๓, ๕-triphenyl tetrazolium chloride (TTC; Fluka) (ใช้ ๑ มิลลิลิตรต่อ TSA ๔๐๐ มิลลิลิตร คือ ๐.๐๐๒๕%)

๒. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่ง ความละเอียด ๐.๐๑ กรัม ตู้อบเพาะเชื้อ ๓๕ ± ๒°ซ ตู้อบร้อน ๑๘๐°ซ เครื่องเขย่า หม้อนึ่งความดันไอ และเครื่องนับโคโลนี

อุปกรณ์ ได้แก่ จานเพาะเชื้อขนาด ๑๕ x ๑๐๐ มิลลิเมตร ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด ๒๕๐ มิลลิลิตร หลอดแก้วขนาด ๑๕ x ๑๐๐ มิลลิเมตร ช้อนตักสาร ไปเปตแก้ว (transfer pipette) ขนาด ๑ และ ๕ มิลลิลิตร และไปเปตอัตโนมัติ และ tip ขนาด ๑ มิลลิลิตร

วิธีดำเนินการ

๑. การเตรียมตัวอย่าง ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีนี้ มุ่งเน้นที่การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนในช่วง ๑๐๐ ถึง ๒,๕๐๐ โคโลนีต่อกรัม โดยเฉพาะการตรวจนับที่ระดับความเจือจางเริ่มต้น ๑:๑๐ เนื่องจากไม่มีวัสดุอ้างอิงที่ทราบปริมาณเชื้อแน่นอน และตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่แล้วโดยธรรมชาติ อาจมีปริมาณเชื้อมากหรือน้อยกว่าปริมาณที่ต้องการศึกษาวิจัย จึงใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างให้มีเชื้อปนเปื้อนโดยการผสม (contamination by mixture)[๑๙] ดังนี้

๑.๑ ใช้แป้งฝุ่นโรยตัวสำหรับเด็กที่มีจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพมหานคร จำนวน ๒ รุ่นผลิต ๆ ละ ๑,๐๐๐ กรัม ซึ่งกองเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายทำการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นแล้วว่าไม่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน และสภาวะที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี SPC และวิธี SPC+TTC สามารถลบล้างวัตถุกันเสีย TTC หรือสารเคมีอื่น ๆ ในสูตรตำรับซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อได้ จึงสามารถใช้แป้งฝุ่นดังกล่าวเป็นตัวแทนของเครื่องสำอางชนิดผงที่ไม่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์

๑.๒ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดผงอื่น ๆ ซึ่งกองเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายได้รับจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาและหน่วยงานเอกชนระหว่าง พ.ศ. ๒๕๔๗ - ๒๕๔๘ โดยเลือกมาจำนวน ๓๐ ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่มีสูตรตำรับแตกต่างกัน และผ่านการตรวจวิเคราะห์แล้วว่ามีจุลินทรีย์ปนเปื้อนหลากหลายชนิดและในปริมาณแตกต่างกัน เช่น แป้งร่ำ แป้งฝุ่นผสมสมุนไพร ผงพอกหน้าและผงขัดหน้า-ขัดผิวสมุนไพร เกลือขัดผิวสมุนไพร

๑.๓ นำตัวอย่างข้อ ๑.๑ และ ๑.๒ มาผสมกันโดยใช้ข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนจากผลการตรวจวิเคราะห์เดิม เพื่อเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณเชื้อปนเปื้อนในระดับต่าง ๆ กันรวมจำนวน ๙๐ ตัวอย่าง ทั้งนี้มุ่งเน้นให้ตัวอย่างส่วนใหญ่มีปริมาณเชื้อปนเปื้อนอยู่ระหว่าง ๑๐๐ ถึง ๒,๕๐๐ โคโลนีต่อกรัม

๒. แผนการตรวจวิเคราะห์และการวิเคราะห์ข้อมูล

๒.๑ เพื่อทดสอบการใช้ได้ของวิธีทางเลือก SPC+TTC

แต่ละตัวอย่างให้นักวิเคราะห์ ๑ คน ทำการวิเคราะห์ ๒ ซ้ำ (duplicate) ทั้งด้วยวิธี SPC และวิธี SPC+TTC ไปพร้อม ๆ กัน รวม ๙๐ ตัวอย่าง

๒.๑.๑ ประเมินความแม่นยำสัมพัทธ์[๑๙] (relative accuracy) และความเที่ยงตรง (precision)

ของวิธีทางเลือก SPC+TTC กับวิธี SPC โดยพิจารณาจากการคำนวณทางสถิติ* ด้วยวิธีวิเคราะห์ถดถอยและการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และพิจารณากราฟ residual plot ได้แก่ :

- สมการเส้นตรง $y = a + bx$ โดย "a" และ "b" ควรมีค่าใกล้เคียง ๐ และ ๑ ตามลำดับ

- ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) และค่า r^2 ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียง ๑

- ค่า confidence limits (CL) ที่ระดับความน่าจะเป็นร้อยละ ๙๕

- ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity หรือ lack-of-fit) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบด้วย F-distribution (α = ๐.๐๕) ต้องไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > ๐.๐๕$)

- กราฟ residual plot แสดงความแตกต่างของผลการทดสอบเมื่อเทียบกับเส้นกราฟที่ได้จากสมการเส้นตรง สำหรับค่า x ทุก ๆ ช่วง โดยค่า residuals ควรมีการกระจายรอบค่า ๐ คือมีทั้งค่าบวก และลบ โดยต้องไม่มีรูปแบบของการกระจาย

- ความเที่ยงตรงของวิธี ประมาณได้จากค่า repeatability standard deviation (S_r) ต้องมีค่าไม่มากกว่า ๒

๒.๑.๒ ประเมินข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ[๑๓] (detection and quantification limits) โดยการคำนวณจากผลการทดสอบของวิธี SPC+TTC ทำได้ดังนี้ :-

• ค่า critical level (LC) ซึ่งเป็นจำนวนน้อยที่สุดของแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี SPC+TTC แต่ไม่จัดเป็นจำนวนนับที่แน่นอน มีความน่าจะเป็นที่จะเกิด false negative ถึงร้อยละ ๕๐ คำนวณได้จากสมการ

$$LC = 1.65\ S_o + X_o \quad (๑)$$

• ค่า limit of detection (LOD) ซึ่งมีค่ามากกว่า LC เป็นจำนวนน้อยที่สุดของแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี SPC+TTC มีความน่าจะเป็นที่จะเกิดผลลบลวงน้อยกว่าร้อยละ ๕๐ คำนวณได้จากสมการ

$$LOD = 3.3\ S_o + X_o \quad (๒)$$

• ค่า limit of quantification (LOQ) ซึ่งเป็นจำนวนน้อยที่สุดของแบคทีเรียที่สามารถตรวจวัดและหาปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ คำนวณได้จากสมการ

$$LOQ = 10\ S_o + X_o \quad (๓)$$

เมื่อ S_o ประมาณได้จากการคำนวณค่า residual standard deviation, STEYX (y):(x)

$$STEYX\ (y):(x) = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} \Sigma (y - \overline{y})^2 \frac{\Sigma (x - \overline{x})(y - \overline{y})^2}{\Sigma (x - \overline{x})^2}} \quad (๔)$$

โดย n คือขนาดของตัวอย่าง ค่า x และ y เป็นค่าเฉลี่ยของตัวอย่างจากวิธี SPC และวิธี SPC+TTC ตามลำดับ และ X_o คือค่า "a" จากสมการเส้นตรง $y = a + bx$ (ข้อ ๒.๑.๑)

๒.๒ เพื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณโดยวิธี SPC+TTC

ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี SPC+TTC โดยเปลี่ยนแปลงสององค์ประกอบในการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ ผู้วิเคราะห์ (operator) และเครื่องมือวิเคราะห์ (equipment) แต่ละตัวอย่างให้นักวิเคราะห์หนึ่งคนทำการวิเคราะห์ ๒ ซ้ำโดยใช้ไปเปตอัตโนมัติ และในช่วงเวลาต่อเนื่องกัน ให้นักวิเคราะห์อีกหนึ่งคน ทำการวิเคราะห์ ๒ ซ้ำโดยใช้ไปเปตแก้ว รวม ๒๔ ตัวอย่าง

จากผลการวิเคราะห์ คำนวณค่า combined standard uncertainty $\{u_c(y)\}$ จากค่า standard deviation of reproducibility[๑๔] (S_r) จากสมการ

$$uc(y) = S_r = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} \frac{(Y_{iA} - Y_{iB})^2}{2}} \quad (๕)$$

แล้วจึงคำนวณค่า expanded uncertainty (U) โดยมี coverage factor เท่ากับ ๒ ที่ระดับความเชื่อ

*โปรแกรม Microsoft® Excel 97 รุ่น 8.0

มั่นร้อยละ ๙๕ จากสมการ

$$U = 2\ uc(y) = 2\ S_r \qquad (๖)$$

ให้รายงานผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย[๑๔] เป็น x cfu/g $[10^{y-U}, 10^{y+U}]$ เมื่อผลการตรวจนับได้จำนวนแบคทีเรียเท่ากับ $y = \log_{10} x$

๓. วิธีวิเคราะห์

๓.๑ ชั่งตัวอย่าง ๑๐ กรัม ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวเติมสารละลายสำหรับเจือจาง (TSBtw) จำนวน ๙๐ มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างที่ความเจือจาง ๑:๑๐ เขย่าแรง ๆ ให้ตัวอย่างกระจายดีในสารละลาย แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ทันที

๓.๒ ดูดสารละลายตัวอย่างความเจือจาง ๑:๑๐ จากข้อ ๓.๑ ใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ ๑ มิลลิลิตร จำนวน ๔ จาน และในหลอดแก้วบรรจุ TSP ๙ มิลลิลิตร เพื่อได้สารละลายตัวอย่างที่ความเจือจาง ๑:๑๐๐

๓.๓ ดูดสารละลายตัวอย่างความเจือจาง ๑:๑๐๐ จากข้อ ๓.๒ ใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ ๑ มิลลิลิตร จำนวน ๔ จาน แล้วเทอาหารวุ้น TSA และ TSA+TTC ลงในจานเพาะเชื้อชนิดละ ๔ จาน (ดูรูปที่ ๑)

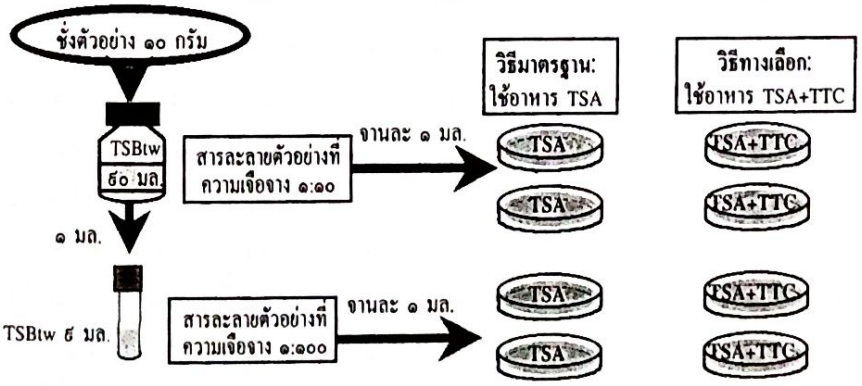
๓.๔ บ่มเพาะเชื้อที่ ๓๕±๒°ซ, ๒๔-๔๘ ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณจำนวนโคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง โดยคูณด้วยอัตราส่วนการเจือจาง แปลงค่าจำนวนโคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง เป็นค่า $\log_{10}$ โคโลนีต่อกรัม

ผลการศึกษา

การประเมินการใช้ได้ของวิธีทางเลือก (SPC+TTC) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานการตรวจนับในจานเพาะเชื้อ (SPC) ในการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดผงจำนวน ๙๐ ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ ๒ ซ้ำ และแสดงผลเป็นค่า log ของโคโลนีต่อกรัมตัวอย่างในตารางที่ ๑

การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทั้ง ๒ วิธี ด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ถดถอย และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ๒ วิธี โดยแกน X เป็นวิธี SPC และแกน Y เป็นวิธี SPC+TTC (รูปที่ ๒) และกราฟ residual plot แสดงความแตกต่างของผลการตรวจนับจำนวนเมื่อเทียบกับค่าประมาณโดยกราฟเส้นตรงที่สร้างจากสมการ (รูปที่ ๓) มีผลดังนี้ :-

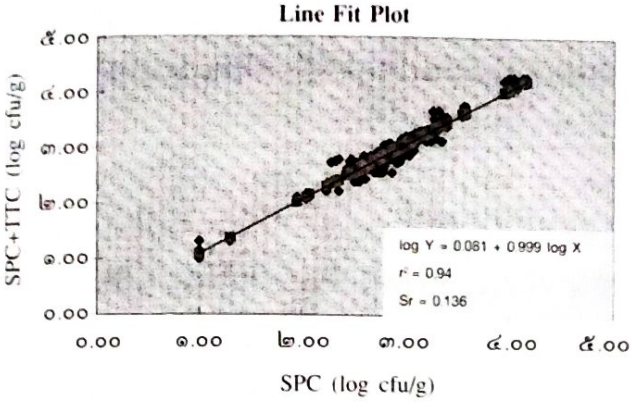
- ได้กราฟที่มีสมการเส้นตรง $\log Y = 0.081 + 0.999 \log X$ ตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity หรือ lack-of-fit) มีค่า F-distribution เท่ากับ ๐.๒๐๘ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ [Fcrit : (88, 90; $\alpha = 0.05$) เท่ากับ ๑.๔๒]



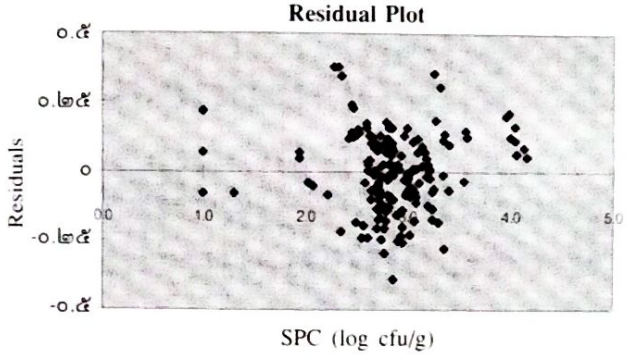
รูปที่ ๑ ขั้นตอนการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในสารละลายตัวอย่างที่ความเจือจาง ๑:๑๐ และ ๑:๑๐๐ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ตามวิธีมาตรฐาน (SPC) และใช้ TSA+TTC ตามวิธีทางเลือก (SPC+TTC)

ตารางที่ ๑ ค่า log ของจำนวนโคโลนีต่อกรัม จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดผง ๕๐ ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ ๒ ซ้ำ ด้วยวิธี มาตรฐานการตรวจนับในจานเพาะเชื้อ (Standard plate count, SPC) และวิธีทางเลือก (SPC + TTC)

ตัวอย่างที่	SPC (log cfu/g)		SPC + TTC (log cfu/g)		ตัวอย่างที่	SPC (log cfu/g)		SPC + TTC (log cfu/g)		ตัวอย่างที่	SPC (log cfu/g)		SPC + TTC (log cfu/g)	
	ซ้ำที่ ๑	ซ้ำที่ ๒	ซ้ำที่ ๑	ซ้ำที่ ๒		ซ้ำที่ ๑	ซ้ำที่ ๒	ซ้ำที่ ๑	ซ้ำที่ ๒		ซ้ำที่ ๑	ซ้ำที่ ๒	ซ้ำที่ ๑	ซ้ำที่ ๒
๑	๑.๐๐	๑.๐๐	๑.๐๐	๑.๐๐	๓๑	๒.๗๖	๒.๗๖	๒.๗๒	๒.๖๔	๖๑	๓.๐๔	๓.๐๖	๓.๐๕	๓.๐๔
๒	๑.๐๐	๑.๓๐	๑.๐๐	๑.๐๐	๓๒	๒.๗๗	๒.๕๐	๒.๕๕	๒.๕๑	๖๒	๓.๐๔	๓.๑๐	๓.๐๒	๒.๔๕
๓	๑.๐๐	๑.๓๐	๑.๐๐	๑.๐๐	๓๓	๒.๗๗	๒.๗๐	๒.๔๐	๒.๖๗	๖๓	๓.๐๔	๓.๐๗	๒.๕๑	๒.๔๑
๔	๑.๓๐	๑. ๓๐	๑.๓๐	๑.๐๐	๓๔	๒.๗๔	๒.๗๕	๒.๓๒	๒.๔๖	๖๔	๓.๐๔	๓.๐๖	๓.๐๖	๓.๐๑
๕	๒.๑๕	๒.๓๐	๒.๒๓	๒.๓๖	๓๕	๒.๔๐	๒.๖๐	๒.๗๒	๒.๗๔	๖๕	๓.๐๕	๒.๕๓	๒.๔๕	๓.๐๑
๖	๒.๒๐	๑.๕๕	๑.๕๕	๒.๐๔	๓๖	๒.๔๐	๒.๕๓	๒.๔๑	๒.๗๖	๖๖	๓.๑๐	๓.๐๓	๓.๐๑	๓.๐๐
๗	๒.๒๖	๑.๕๕	๑.๕๕	๒.๐๔	๓๗	๒.๔๑	๒.๕๐	๒.๗๐	๒.๔๑	๖๗	๓.๑๐	๒.๕๔	๓.๐๔	๓.๐๐
๘	๒.๔๐	๒.๔๐	๒.๕๑	๒.๕๖	๓๘	๒.๔๑	๒.๔๔	๒.๖๔	๒.๔๓	๖๘	๓.๑๔	๓.๑๓	๓.๐๕	๓.๐๕
๙	๒.๔๕	๒.๖๗	๒.๗๘	๒.๔๗	๓๙	๒.๔๑	๒.๖๕	๒.๖๗	๒.๕๓	๖๙	๓.๑๖	๓.๑๔	๒.๕๖	๓.๐๔
๑๐	๒.๕๑	๒.๔๐	๒.๕๗	๒.๖๑	๔๐	๒.๔๓	๒.๗๕	๒.๔๕	๒.๔๓	๗๐	๓.๑๖	๓.๑๕	๓.๒๐	๓.๑๑
๑๑	๒.๕๔	๒.๗๔	๒.๗๗	๒.๗๓	๔๑	๒.๔๓	๒.๕๓	๒.๕๔	๓.๐๓	๗๑	๓.๒๑	๓.๑๖	๓.๒๕	๓.๒๔
๑๒	๒.๕๔	๒.๔๑	๒.๖๕	๒.๗๕	๔๒	๒.๔๓	๒.๗๔	๒.๓๖	๒.๔๔	๗๒	๓.๒๑	๓.๑๐	๓.๓๕	๓.๒๕
๑๓	๒.๕๔	๒.๗๔	๒.๗๒	๒.๗๒	๔๓	๒.๔๕	๒.๔๕	๒.๗๑	๒.๖๕	๗๓	๓.๒๔	๓.๒๓	๓.๐๐	๓.๐๕
๑๔	๒.๕๕	๒.๕๖	๒.๗๐	๒.๗๔	๔๔	๒.๔๖	๒.๔๕	๒.๖๐	๒.๖๕	๗๔	๓.๒๖	๓.๓๒	๓.๒๑	๓.๒๐
๑๕	๒.๖๑	๒.๔๕	๒.๖๑	๒.๖๒	๔๕	๒.๔๗	๒.๔๑	๒.๖๐	๒.๖๗	๗๕	๓.๒๖	๓.๒๒	๓.๑๔	๓.๒๔
๑๖	๒.๖๒	๒.๕๐	๒.๔๑	๒.๔๑	๔๖	๒.๔๕	๒.๕๔	๒.๔๓	๒.๗๖	๗๖	๓.๒๗	๓.๒๖	๓.๒๑	๓.๒๕
๑๗	๒.๖๖	๒.๔๔	๒.๕๓	๒.๕๕	๔๗	๒.๕๐	๒.๕๖	๒.๔๓	๒.๔๓	๗๗	๓.๒๔	๓.๒๐	๓.๐๕	๓.๑๔
๑๘	๒.๖๔	๒.๔๐	๒.๕๒	๒.๗๒	๔๘	๒.๕๔	๓.๐๐	๒.๔๓	๒.๔๔	๗๘	๓.๓๐	๓.๕๒	๓.๓๔	๓.๔๐
๑๙	๒.๖๔	๒.๖๒	๒.๖๔	๒.๗๐	๔๙	๒.๕๕	๒.๖๕	๒.๗๒	๒.๗๔	๗๙	๓.๓๑	๓.๓๑	๓.๑๔	๓.๑๔
๒๐	๒.๗๐	๒.๗๗	๒.๔๓	๒.๗๔	๕๐	๒.๕๔	๒.๕๑	๒.๗๕	๒.๗๓	๘๐	๓.๓๒	๓.๓๐	๓.๑๖	๓.๒๐
๒๑	๒.๗๐	๒.๕๐	๒.๗๒	๒.๔๑	๕๑	๒.๕๕	๒.๔๖	๒.๔๖	๒.๔๕	๘๑	๓.๓๓	๓.๒๖	๓.๑๐	๓.๒๑
๒๒	๒.๗๐	๒.๕๖	๒.๕๕	๒.๔๓	๕๒	๒.๕๕	๒.๕๕	๒.๕๔	๓.๐๗	๘๒	๓.๔๕	๓.๕๔	๓.๓๔	๓.๒๗
๒๓	๒.๗๑	๒.๗๔	๒.๗๓	๒.๕๑	๕๓	๓.๐๐	๓.๐๐	๓.๐๐	๓.๐๐	๘๓	๓.๕๓	๓.๖๑	๓.๓๕	๓.๓๖
๒๔	๒.๗๒	๒.๗๒	๒.๗๔	๒.๗๕	๕๔	๓.๐๐	๓.๐๑	๒.๔๑	๒.๕๒	๘๔	๓.๕๔	๓.๖๓	๓.๕๔	๓.๕๔
๒๕	๒.๗๒	๒.๖๕	๒.๔๕	๒.๖๒	๕๕	๓.๐๒	๓.๐๔	๓.๐๔	๓.๐๓	๘๕	๓.๖๔	๓.๗๑	๓.๒๖	๓.๓๑
๒๖	๒.๗๒	๒.๗๕	๒.๗๑	๒.๗๕	๕๖	๓.๐๒	๒.๕๕	๒.๕๐	๒.๕๖	๘๖	๓.๔๕	๓.๖๔	๓.๕๔	๓.๕๖
๒๗	๒.๗๓	๒.๖๓	๒.๔๔	๒.๔๖	๕๗	๓.๐๒	๒.๕๗	๒.๔๓	๒.๔๓	๘๗	๔.๒๑	๔.๒๖	๔.๐๕	๓.๕๕
๒๘	๒.๗๓	๒.๗๗	๒.๕๒	๒.๖๓	๕๘	๓.๐๓	๒.๕๖	๒.๔๓	๒.๔๓	๘๘	๔.๒๑	๔.๑๕	๔.๐๖	๔.๐๑
๒๙	๒.๗๔	๒.๕๔	๒.๔๖	๒.๖๓	๕๙	๓.๐๖	๓.๐๔	๒.๗๕	๒.๔๑	๘๙	๔.๒๕	๔.๒๘	๔.๑๖	๔.๑๑
๓๐	๒.๗๖	๒.๔๘	๒.๖๔	๒.๗๒	๖๐	๓.๐๗	๒.๕๘	๒.๔๕	๒.๔๗	๙๐	๔.๓๐	๔.๒๖	๔.๐๔	๓.๕๕



รูปที่ ๒ ความสัมพันธ์ของการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี SPC+TTC และวิธี SPC ในตัวอย่างเครื่องสำอางที่มีปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนในช่วง log ๑.๐๐ ถึง ๔.๓๐ cfu/g



รูปที่ ๓ ความแตกต่างของผลการตรวจนับจำนวนด้วยวิธี SPC กับค่าประมาณจากกราฟเส้นตรงที่สร้างจากสมการ log Y = 0.081+ 0.999 log X

- ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ ๐.๙๗
- ค่า r^2 เท่ากับ ๐.๙๔
- confidence limits (CL) ที่ระดับความน่าจะเป็นร้อยละ ๙๕ : ๐.๐๒๖ < a < ๐.๑๘๘ และ ๐.๙๖๒ < b < ๑.๐๓๗
- ค่า repeatability standard deviation (S_r) เท่ากับ ๐.๑๓๖

การประเมินข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ[๑๔] ของวิธี SPC+TTC มีผลดังนี้ :-

- ค่า critical level เท่ากับ log ๐.๒๘ หรือประมาณเท่ากับ ๒ cfu
- ค่า LOD เท่ากับ log ๐.๔๘ หรือประมาณเท่ากับ ๓ cfu
- ค่า LOQ เท่ากับ log ๑.๓๐ หรือประมาณเท่ากับ ๒๐ cfu

เมื่อ S_o และ X_o มีค่าเท่ากับ ๐.๑๒๒ และ ๐.๐๘๑ ตามลำดับ

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณโดยวิธีทางเลือก SPC+TTC จากการตรวจวิเคราะห์ที่มีการเปลี่ยนแปลงสององค์ประกอบ ได้แก่ ผู้วิเคราะห์ และเครื่องมือวิเคราะห์ แสดงผลในตารางที่ ๒ เป็นค่า $\log_{10}$ โคโลนีต่อกรัม คำนวณค่า combined standard uncertainty $\{u_c(y)\}$ และค่า expanded uncertainty (U) จากสมการที่ (๕) และ (๖) ได้เท่ากับ ๐.๐๔๐๕ และ ๐.๐๘๑ ตามลำดับ

รายงานผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียพร้อมค่าความไม่แน่นอนของการวัด

x cfu/g $[10^{y-0.081}, 10^{y+0.081}]$

เมื่อผลการตรวจนับได้จำนวนแบคทีเรียเท่ากับ $y = \log_{10} x$

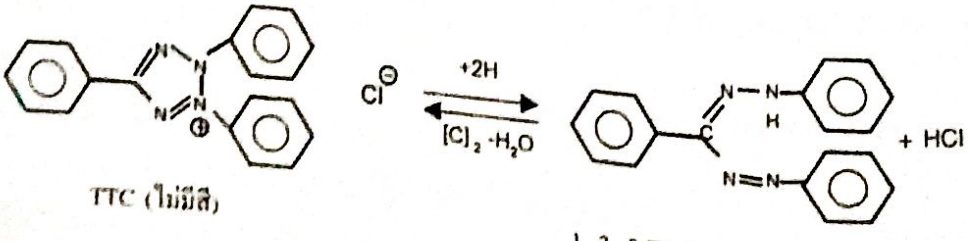
วิจารณ์

การทดสอบการใช้ได้ของวิธี SPC + TTC เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานในการตรวจนับเฉพาะแบคทีเรีย โดยไม่เปรียบเทียบสำหรับการตรวจนับยีสต์และรา เนื่องจากโคโลนียีสต์และรา มีลักษณะที่สามารถจำแนกได้ชัดเจนจากตะกอนตัวอย่าง ทำให้ไม่มีปัญหาในการตรวจนับ

2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นสารในกลุ่ม tetrazolium salt จัดเป็นสารบ่งชี้ที่มีความไวสูงต่อปฏิกิริยารีดอกซ์โดยเอนไซม์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติทั่วไปของจุลินทรีย์ จึงมีการนำมาใช้ตรวจสอบปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสมดุลรีดอกซ์ (redox equivalent) จากการถ่ายไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปยัง tetrazolium salt แล้วได้ formazan[๑๗] (รูปที่ ๔) ซึ่ง

ตารางที่ ๒ ค่า log ของจำนวนโคโลนีต่อกรัม และค่าแตกต่างจากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีทางเลือก (SPC + TTC) ในตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดผง ๒๔ ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ ๒ ซ้ำ โดยผู้วิเคราะห์และเครื่องมือแตกต่างกัน

ตัวอย่างที่ j	Autopipette (log cfu/g)		ค่าเฉลี่ย y_{j1}	Transfer pipette (log cfu/g)		ค่าเฉลี่ย y_{j2}	$W_j = \lvert y_{j1} - y_{j2} \rvert$	W_j^2
	ซ้ำที่ ๑	ซ้ำที่ ๒		ซ้ำที่ ๑	ซ้ำที่ ๒			
๑	๒.๔๑	๒.๕๑	๒.๔๖	๒.๔๒	๒.๔๐	๒.๔๑	๐.๐๔๕	๒.๐๕
๒	๒.๔๕	๒.๔๘	๒.๔๗	๒.๗๐	๒.๕๔	๒.๖๒	๐.๑๔๖	๒.๒๑
๓	๒.๕๖	๒.๖๒	๒.๕๖	๒.๕๒	๒.๖๘	๒.๖๐	๐.๐๐๗	๕.๕๓
๔	๒.๕๘	๒.๖๓	๒.๖๐	๒.๕๒	๒.๖๘	๒.๖๐	๐.๐๐๖	๔.๒๐
๕	๒.๖๑	๒.๗๑	๒.๖๖	๒.๖๕	๒.๖๕	๒.๖๕	๐.๐๑๒	๑.๔๐
๖	๒.๖๔	๒.๔๗	๒.๕๕	๒.๖๓	๒.๖๑	๒.๖๒	๐.๐๖๔	๔.๐๗
๗	๒.๖๕	๒.๗๖	๒.๗๒	๒.๘๗	๒.๘๐	๒.๘๓	๐.๑๑๔	๑.๓๐
๘	๒.๗๐	๒.๗๕	๒.๗๓	๒.๗๕	๒.๗๒	๒.๗๔	๐.๐๑๐	๑.๑๐
๙	๒.๗๓	๒.๗๖	๒.๗๔	๒.๘๖	๒.๘๐	๒.๘๓	๐.๐๘๘	๗.๗๓
๑๐	๒.๗๖	๒.๘๑	๒.๗๖	๒.๗๖	๒.๗๖	๒.๗๖	๐.๐๒๕	๖.๑๒
๑๑	๒.๘๑	๒.๗๖	๒.๘๐	๒.๗๖	๒.๗๖	๒.๗๖	๐.๐๓๖	๑.๒๗
๑๒	๒.๘๕	๒.๗๖	๒.๘๑	๒.๘๓	๒.๘๓	๒.๘๓	๐.๐๑๖	๓.๕๔
๑๓	๒.๘๖	๒.๖๔	๒.๖๐	๒.๘๗	๒.๘๐	๒.๘๓	๐.๐๖๗	๔.๔๗
๑๔	๒.๘๘	๒.๘๑	๒.๘๕	๒.๘๕	๒.๘๗	๒.๘๖	๐.๐๑๕	๒.๒๕
๑๕	๒.๖๔	๓.๐๐	๒.๖๗	๓.๐๓	๓.๐๓	๓.๐๓	๐.๐๖๐	๓.๖๔
๑๖	๓.๐๐	๒.๖๕	๒.๖๗	๓.๐๓	๓.๐๒	๓.๐๒	๐.๐๕๐	๒.๔๖
๑๗	๓.๐๐	๓.๐๔	๓.๐๒	๓.๐๒	๒.๘๖	๒.๖๕	๐.๐๖๖	๔.๓๕
๑๘	๓.๐๕	๓.๐๗	๓.๐๖	๓.๐๓	๓.๐๓	๓.๐๓	๐.๐๒๖	๘.๕๖
๑๙	๓.๑๖	๓.๑๘	๓.๑๗	๓.๑๒	๓.๑๖	๓.๑๔	๐.๐๓๕	๑.๒๕
๒๐	๓.๒๐	๓.๑๖	๓.๑๘	๓.๑๒	๓.๑๖	๓.๑๔	๐.๐๔๔	๑.๖๖
๒๑	๓.๒๓	๓.๒๗	๓.๒๕	๓.๓๐	๓.๒๑	๓.๒๖	๐.๐๐๕	๒.๔๗
๒๒	๓.๓๘	๓.๓๑	๓.๓๔	๓.๓๔	๓.๒๘	๓.๓๑	๐.๐๒๘	๘.๔๑
๒๓	๓.๔๕	๓.๔๗	๓.๔๖	๓.๔๖	๓.๕๗	๓.๕๒	๐.๐๕๗	๓.๒๓
๒๔	๔.๐๐	๔.๐๓	๔.๐๒	๔.๐๑	๔.๑๔	๔.๐๘	๐.๐๖๑	๓.๖๗
							$\Sigma W_j^2 =$	๗.๘๖



รูปที่ ๔ วิถีการเปลี่ยนของสาร TTC ไปเป็น formazan ซึ่งมีสีแดง[๑๕]

เป็นรงควัตถุที่มีสีแดง เมื่อนำ TTC มาใช้ในวิธีการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ ช่วยให้การตรวจนับชัดเจน แม้โคโลนีจะมีขนาดเล็กมาก (เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า ๐.๒ มิลลิเมตร)[๒๐]

รายงานวิจัยต่าง ๆ[๕,๖,๑๙] ระบุว่า TTC ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน อาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ สำหรับการนำ TTC มาใช้ในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางซึ่งสูตรตำรับส่วนใหญ่มีสารกันเสีย (preservative) เป็นส่วนผสม Ohara และ Saito[๖] รายงานวิธีขจัดปัญหาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์นี้ในการตรวจวิเคราะห์เครื่องสำอางชนิดครีมและโลชั่น โดยใช้วิธีเทวุ้น (overlay) ที่ผสมร้อยละ ๐.๑ TTC ลงบนผิวหน้าของวุ้นซึ่งบ่มเพาะนาน ๔๘ ชั่วโมง แล้วจึงนำไปบ่มเพาะอีก ๑ ชั่วโมงก่อนนำมานับจำนวนแบคทีเรียที่ติดสีแดง แต่ในการศึกษาเบื้องต้นในการวิจัยนี้ พบว่าวิธี overlay นี้ไม่สะดวกหากนำมาใช้ในการปฏิบัติงานประจำที่มีปริมาณมาก นอกจากนี้ หากมีการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดแผ่ลาม (spreader) อาจมีผลให้แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ไม่เจริญ (suppress) ต้องเพิ่มเวลาบ่มเพาะนานขึ้นเพื่อให้ TTC ซึมผ่านวุ้นได้ทั่วถึงและทำการตรวจนับได้ยาก การวิจัยนี้จึงใช้วิธีมาตรฐานคือวิธี pour plate และใช้สารละลายสำหรับเจือจาง TSBtw ที่สามารถลบล้างฤทธิ์ของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง[๑๗] เพื่อลดปัญหาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเกิดจากตัวอย่างที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ (carry over) และทดสอบการเติม TTC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ[๕,๑๓] ลงใน TSA ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ๐.๐๐๒๕% (w/v)[๑๙] อย่างไรก็ตาม พบว่าสภาวะในการทดสอบนี้ยังไม่เหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดผงที่ในสูตรตำรับมีสารอื่น ๆ เช่น menthol camphor ในแป้งเย็น หรือยาสีฟันชนิดผง ซึ่งอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงวิธีการตรวจวิเคราะห์ เช่น เพิ่มความเจือจางตัวอย่าง ปรับปรุงสารละลายสำหรับเจือจาง และทดสอบการใช้ได้ของวิธีสำหรับการนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ต่อไป

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทางเลือก SPC+TTC กับวิธี SPC โดยไม่มีวัสดุอ้างอิงที่ทราบปริมาณเชื้อแน่นอนนี้ ทำให้ไม่สามารถประมาณค่าความแม่นยำของวิธีทางเลือกได้ แต่จะเป็นการประมาณค่าความแม่นยำสัมพัทธ์[๑๙] โดยเตรียมตัวอย่างให้มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนโดยการผสม แล้วเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างเดียวกันที่ตรวจโดยวิธีทางเลือกและวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้ การใช้ตัวอย่างซึ่งมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่แล้วมาผสมให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ที่ต้องการนี้ ทำให้มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ และมีสภาวะในการทดสอบเหมือนจริง โดยระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ทำการทดสอบมีค่าระหว่าง log ๑.๐๐ ถึง ๔.๓๐ cfu/g ซึ่งมีการกระจายครอบคลุมช่วงการปนเปื้อนที่สนใจ คือ ระหว่าง ๑๐๐ ถึง ๒,๕๐๐ โคโลนีต่อกรัม (log ๒.๐ ถึง log ๓.๔ cfu/g) โดยเฉพาะที่ปริมาณใกล้เคียงค่าวิกฤต (เกณฑ์มาตรฐาน ๑,๐๐๐ โคโลนีต่อกรัมหรือ log ๓.๐ cfu/g) (รูปที่ ๒) พบว่าวิธี SPC+TTC ให้ค่าการตรวจวิเคราะห์สัมพันธ์กับวิธี SPC เป็นอย่างดีและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีค่า r^2 เท่ากับ ๐.๙๔ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ ๐.๙๗ ความสัมพันธ์ในแนวเส้นตรงของทั้ง ๒ วิธีแสดงได้ชัดเจนด้วยกราฟ line fit จากสมการเส้นตรง $\log Y = 0.081 + 0.999 \log X$ ซึ่งเป็นเส้นตรงที่ผ่านจุดศูนย์ โดยจากการวิเคราะห์ถดถอย พบว่ามีค่า p-value เท่ากับ ๐.๑๓๗ ค่า intercept a มีค่าอยู่ระหว่าง ๐ และค่า slope b อยู่ระหว่างค่า ๑ เมื่อตรวจสอบความเป็นเส้นตรงด้วย F-distribution (α = ๐.๐๕) พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกราฟ residual plot ซึ่งแสดงความแตกต่างของผลการตรวจนับจำนวนด้วยวิธี SPC กับค่าประมาณจากกราฟเส้นตรงนี้ พบว่ามีการกระจายครอบคลุมค่า ๐ ทั้งด้านบวก (เหนือแกน X) และด้านลบ

(ได้แกน x) นอกจากนี้ วิธีทางเลือกมีความเที่ยงตรงโดยประมาณได้จากค่า repeatability standard deviation (S_r) เท่ากับ ๐.๑๙๐ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

ในการประเมินข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ[๒๙] ของวิธีทางเลือก SPC+TTC พบว่าค่า LOQ ของวิธี SPC+TTC ซึ่งได้จากการคำนวณเท่ากับ ๒๐ cfu มีค่าใกล้เคียงกับค่า LOQ ๒๕ cfu ที่แนะนำในมาตรฐานการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์[๓๐] และห้องปฏิบัติการแห่งนี้ใช้เป็นปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถใช้ในการคำนวณผลได้ค่า LC, LOD และ LOQ นี้ อาจมีค่าแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบต่าง ๆ ในสภาวะของการทดสอบในแต่ละห้องปฏิบัติการ ผู้ทดสอบจึงควรประเมินค่า LC, LOD และ LOQ เฉพาะสำหรับห้องปฏิบัติการตนเอง

ISO/TS 19036[๓๑] ได้ระบุไว้ชัดเจนว่า การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณด้านจุลชีววิทยามีวิธีคิดแตกต่างจากแบบ step-by-step approach ใน EURACHEM/CITAC Guide[๓๒] ซึ่งส่วนใหญ่เหมาะสมสำหรับการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณด้านเคมี เนื่องจากการประมาณค่าความไม่แน่นอน จากแต่ละ source of uncertainty ในแต่ละขั้นตอนในการทดสอบด้านจุลชีววิทยา ทำได้ยากและอาจเกิดความผิดพลาดได้ จึงให้ใช้หลักการคิดแบบ top-down หรือ global approach โดยประมาณค่าความไม่แน่นอนจากผลการทดสอบสุดท้ายที่ผ่านขั้นตอนการทดสอบทั้งหมดมาแล้วโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน แล้วคำนวณค่า Intralaboratory Standard deviation of Reproducibility (S_r) ซึ่งเป็นค่าประมาณของค่า Combined standard uncertainty ($u_c(y)$) จากนั้นจึงคำนวณค่า Expanded uncertainty (U) ได้จาก $2u_c(y)$ ทั้งนี้ ISO/TS 19036 ใช้หลักการและสมการในการคำนวณค่า Standard deviation of reproducibility เช่นเดียวกับ ISO 5725-3[๓๓] ซึ่งมีการประเมินค่า Intermediate precision standard deviation สำหรับการตรวจวัดปริมาณที่ดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน โดยระบุ ๔ องค์ประกอบที่หากเปลี่ยนแปลงจะกระทบต่อผลการวัดได้ ได้แก่ เวลาในการตรวจวัด การสอบเทียบระหว่างการตรวจวัด ผู้วิเคราะห์ และเครื่องมือวิเคราะห์ ทั้งนี้ สำหรับการตรวจวัดปริมาณด้านจุลชีววิทยา จำนวนจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงเองโดยธรรมชาติเมื่อระยะเวลาในการทดสอบต่างกัน การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเวลาและการสอบเทียบระหว่างการตรวจวัด จึงไม่เหมาะสม ในการวิจัยนี้จึงเปลี่ยนแปลง ๒ องค์ประกอบคือ ผู้วิเคราะห์ และเครื่องมือวิเคราะห์

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่ศึกษานี้สามารถใช้วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดผงได้แม่นยำและเที่ยงตรง ได้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีมาตรฐาน การนำ TTC มาใช้มีขั้นตอนเพิ่มเติมที่สั้นและง่าย ช่วยให้โคโลนีแบคทีเรียมีสีแดงสังเกตได้ชัดเจน ทำให้งานตรวจนับจำนวนแบคทีเรียสะดวกขึ้น ลดเวลาในการตรวจนับ และมีความแม่นยำมากขึ้น โดยเฉพาะการตรวจนับที่ระดับความเจือจางเริ่มต้น ๑:๑๐ ซึ่งยังมีตะกอนด้วยอย่างผสมอยู่มาก สามารถใช้ได้อย่างเหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมที่ไม่ละลายน้ำ ยกเว้นสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ในสูตรตำรับอาจมีสารอื่น ๆ ที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น แป้งเย็น ยาสีฟันชนิดผง ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับปรุงวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีสำหรับผลิตภัณฑ์เหล่านี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมืออย่างดียิ่ง จากเพื่องานในกลุ่มงานทดสอบทางชีววิทยาและความปลอดภัย กองเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และขอขอบคุณ คุณเพ็ญศรี รอดมา และคุณประเสริฐ รอดเฟื่องสังคหะ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่กรุณาให้คำ

แนะนำในการคำนวณทางสถิติและจัดทำนิพนธ์ต้นฉบับในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

๑. Morton RD. Aerobic plate count. In: Downes FP, Ito K, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2001. p. 63-7.

๒. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. ๒๕๓๕. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ ๑๐๕, ตอนที่ ๔๒ (ลงวันที่ ๘ เมษายน ๒๕๓๕).

๓. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เครื่องสำอาง: ข้อกำหนดทั่วไป. มอก. ๑๕๒-๒๕๓๕. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไปเล่มที่ ๑๑๓, ตอนที่ ๘๕ง (ลงวันที่ ๒๒ ตุลาคม ๒๕๓๕).

๔. Swanson KMJ, Petran RL, Hanlin JH. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes FP, Ito K, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2001. p. 53-62.

๕. Weinberg ED. Selective inhibition of microbial growth by the incorporation of triphenyl tetrazolium chloride in culture media. J Bacteriol 1953; 66: 240-2.

๖. Ohara MT, Saito T. Application of triphenyltetrazolium chloride in microbial limit test of pharmaceuticals and cosmetics. J AOAC Int 1995; 78:1525-9.

๗. Cody HJ, Smith PF, Blaser MJ, La Force FM, Wen-Lan L. Comparison of methods for recovery for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from seeded laundry fabrics. Appl Environ Microbiol 1984; 47:965-70.

๘. Orth DS, Eck KS. Use of triphenyltetrazolium chloride in preservative efficacy testing. J Cosmet Sci 2005; 56:167-74.

๙. Bartlett RC, Mazens MF. Rapid antimicrobial susceptibility test using tetrazolium reduction. Antimicrobial Agents Chemo 1979; 15:769-74.

๑๐. Coudron PE, Ford JM, Dalton HP. Tetrazolium reduction as an aid for Streptococcal growth detection with agar dilution susceptibility testing. J Clin Microbiol 1983; 18:765-9.

๑๑. Jamber B. Reduction of tetrazolium salt. Nature 1954; 173:774-5.

๑๒. Lederberg J. Detection of fermentative variants with tetrazolium. J Bacteriol 1948; 56:695.

๑๓. Tengerdy RP, Nagy JG, Martin B. Quantitative measurement of bacterial growth by the reduction of tetrazolium salts. Appl Microbiol 1967; 15:954-5.

๑๔. The International Organization for Standardization: ISO 16140 Microbiology of food and animal feeding stuffs-protocol for the validation of alternative methods. Switzerland: International Organization for Standardization; 2003.

๑๕. The International Organization for Standardization: ISO 5725-3. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. 1st ed. Switzerland: International Organization for Standardization; 1994.

๑๖. The International Organization for Standardization: ISO/TS 19036. Microbiology of food and animal feeding stuffs-guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. 1st ed. Switzerland: International Organization for Standardization; 2006.

๑๗. Anonymous. Microbial limit tests. In: The United States Pharmacopeia 29, Asian ed., Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention; 2006. p. 2503-8.

๑๘. Hitchins AD, Tran TT, McCarron JE. Chapter 23 microbiological methods for cosmetics. In: U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition Bacteriological Analytical Manual online. 2001 Oct 30. [cited 2005 Apr 5]; Available from: URL: http://www.cfsan.fda.gov/~ebam-23.html

๑๙. Bochner BR, Savageau MA. Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. Appl Environ Microbiol 1977; 33:434-44.

๒๐. Kim KH, Yu J, Nahm MH. Efficiency of a pneumococcal opsonophagocytic killing assay improved by multiplexing and by coloring colonies. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:616-21.

๒๑. EURACHEM/CITAC. Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. QUAM: [cited 2005 Apr 5]; Available from: URL: http://www.measurment-uncertainty.org/

Abstract **Validation of an Alternative Bacterial Enumeration Method in Powder Cosmetics**

Suwanna Tiemngeon, Sirinun Thaitrakulpanich, Sirima Saicumnyart

Division of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

Journal of Health Science **2006; 15:383-94.**

An alternative method (SPC+TTC) which additional of 0.0125% (w/v) 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) was validated with a standard plate count method (SPC) used for counting viable bacterial contaminants in 90 cosmetic samples which were water insoluble or contained insoluble materials. The study has been undertaken within the Division of Cosmetics and Hazardous Substances during May-December 2005. The correlation tests showed high correlation values, for example, $r^2 = 0.94$ and $r = 0.97$. The relative accuracy relationship between the alternative and reference method was assessed through the linear model : $\log Y = 0.081 + 0.999 \log X$. Linear relationship between the two methods was indicated by the line fit and residual plots. The linearity test using F-distribution ($\alpha = 0.05$) showed no statistically significant differences. Precision data in term of repeatability standard deviation (S_r) was 0.136. The critical level (LC), the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of this SPC+TTC method for bacterial enumeration were 2, 3 and 20 cfu, respectively. The uncertainty of measurement of SPC+TTC method performed on 24 cosmetic samples yielded an expanded uncertainty (U) of ± 0.081 log. The additional of TTC in this SPC+TTC method has proved useful in red coloring bacterial colonies which are more easily observed, hence the bacterial enumeration in powder cosmetics becomes more convenient, less time consuming and provides a valid result.

Key words: **Contaminated microorganism, cosmetic, enumeration, method validation**